製品コード CY231

食品・環境分析用

TaKaRa

Cycleave® RT-PCR *Giardia* (18S rRNA) Detection Kit

説明書

v201402Da

ジアルジア症はジアルジア（*Giardia lamblia* 異名 *G. intestinalis* または *G. duodenalis*）の感染によって引き起こされる下痢症疾患です。ジアルジアは別名ランブル鞭毛虫とも呼ばれる鞭毛虫類に属する原虫でヒトや動物（ネコ、イヌ、ウシ、鹿、ビーバーなど）の腸に寄生し、糞便中に感染性を持ったシストを大量に排出します。シストで汚染された食品や飲料水を介してヒトに経口感染（糞 - 口感染）します。シストは感染力が強く、報告によって異なりますが水中で数カ月程度は感染力が衰えず、小型であるため浄水処理による完全除去が難しいうえに塩素消毒にも抵抗性を示します。
「感染症新法」において、ジアルジア症は 5 類感染症（全数把握疾患）に指定されています。検出方法としては、蛍光抗体染色やヨード・ヨードカリ染色による検鏡法で原虫の確認が行われています

本製品は、ジアルジア 18S rRNA 遺伝子をターゲットとしてゲノム DNA 上の遺伝子に加え、ジアルジア由来 RNA を逆転写した cDNA も検出するキットです。ゲノム DNA に対し RNA はコピー数が多いことが知られているため、RNA を対象としたリアルタイム PCR 法（リアルタイム RT-PCR 法）により微量のジアルジアを検出できます。リアルタイム PCR 法は、簡便性、迅速性、反応特異性の高さから、近年、環境衛生管理の分野において急速に普及しています。ジアルジアの検出においても、有効活用されることが期待されています。

リアルタイム PCR 法において、増幅産物の検出に採用しているサイクリングプローブ法は RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法で、遺伝子の特定配列を高い特異性をもって検出することができます。プローブは一方の端が蛍光物質で、他方の端がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、配列が相補的な増幅産物とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることで、強い蛍光を発するようになります（図 1 参照）。この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をモニターすることが出来ます。

本キットには、核酸抽出用の試薬と逆転写反応試薬が含まれています。増幅反応には、Hot Start PCR 用酵素の *TaKaRa Ex Taq*® HS を使用しており、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を抑制し、高感度の検出が可能です。また、ジアルジア 18S rRNA 遺伝子を検出するための FAM 標識プローブの他に、インターナルコントロール DNA とインターナルコントロール DNA 検出用の ROX 標識プローブが含まれています。1 本のチューブで二波長を同時にモニタリングすることで、ジアルジア遺伝子の検出（FAM）とインターナルコントロール DNA の検出（ROX）による PCR 反応の可否が確認できます。リアルタイム検出のため、電気泳動が不要であり迅速に結果が得られます。

Giardia Assemblage A から E の検出が可能であり、*Giardia* Positive Control を用いて検量線を作成することでサンプル中に含まれるジアルジアの定量も可能です。

※ 厚生労働省健康局水道課長通知「健水発 0302 第 2 ～ 4 号」（平成 24 年 3 月 2 日発付）
「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための検査方法の見直し等について」にリアルタイム PCR 等による遺伝子検出法が収載されました。

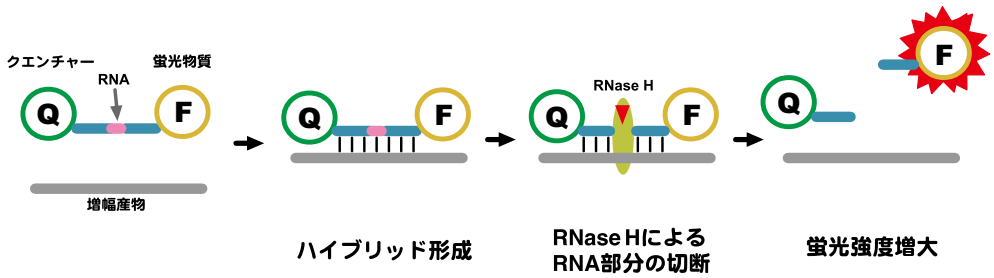


図 1. サイクリングプローブ法の原理

I. キットの内容（25 μl 反応、50 回分）

(1)	5 × PrimeScript® RT Master Mix	5 × conc.	100 μl
(2)	2 × Cycleave Reaction Mixture (*Giardia*)	2 × conc.	625 μl
(3)	*Giardia* Primer/Probe Mix（FAM、ROX）＊1	5 × conc.	250 μl
(4)	RNase Free dH_2O		1 ml
(5)	Lysis Buffer		625 μl × 4
(6)	Proteinase K	20 mg/ml	50 μl
(7)	dH_2O（for Dilution）		150 μl
(8)	*Giardia* Positive Control＊2	1 × 10^5 copies/μl	50 μl
(9)	EASY Dilution（for Real Time PCR）		1 ml × 2

＊1：蛍光標識プローブを含んでいますので、遮光してください。
＊2：リアルタイム PCR コンポーネント（1 ～ 4）に誤って混入すると、正しい検出反応を行うことができなくなります。開封後は、リアルタイム PCR コンポーネント（1 ～ 4）を付属のキットケースに移し、別に保存してください。

【コンポーネントの説明】

5 × PrimeScript RT Master Mix：
逆転写反応試薬です。反応に必要な酵素、Buffer、dNTP Mixture を含みます。粘性が高いため、泡立てないようにゆっくりピペッティングにより、反応液をよく混合してください。

2 × Cycleave Reaction Mixture (*Giardia*)：
リアルタイム PCR 反応試薬です。反応に必要な酵素、Buffer、dNTP Mixture を含みます。解凍後よく混和してご使用ください。泡立てると酵素が失活する恐れがありますのでご注意ください。

Giardia Primer/Probe Mix：
ジアルジア検出用プライマー／プローブの混合液です。インターナルコントロール DNA＊とインターナルコントロール DNA 検出用プライマー／プローブも含みます。それぞれのプライマーにより、ジアルジアの 18S rRNA 遺伝子またはインターナルコントロール DNA を増幅し、FAM 標識プローブによりジアルジアの 18S rRNA 遺伝子を、ROX 標識プローブによりインターナルコントロール DNA を検出します。

＊：インターナルコントロール DNA（IC）
PCR 反応の可否判定を目的とした、ジアルジア遺伝子 (ターゲット) とは無関係な配列を有する DNA 分子です。ターゲット遺伝子が検出されない場合でもインターナルコントロール DNA の検出ができていれば、PCR 反応に阻害等の問題がないことが判断でき、ターゲット遺伝子は検出限界以下と判定できます。ターゲット遺伝子、インターナルコントロール DNA のどちらも検出されない場合、PCR 反応が正常に進まなかったと判定できます。
なお、ターゲット遺伝子の DNA 量が多い場合は、ターゲット遺伝子の増幅が優先され、インターナルコントロール DNA のシグナルの立ち上がりが遅れる、シグナル強度が弱くなる、あるいはシグナルが得られないことがあります。この場合にも、ターゲット遺伝子の検出は正しくなされており、陽性であると判定できます。

RNase Free dH_2O：
逆転写反応液の調製と PCR 反応液の調製に使用します。

Lysis Buffer：
核酸抽出用試薬です。VI. サンプルの調製例 [核酸の抽出] で使用します。
組成：40 mM NaCl、0.2% Triton X-100、4 mM DTT を含む TE Buffer

Proteinase K：
核酸抽出用試薬です。VI. サンプルの調製例 [核酸の抽出] で使用します。
使用直前に、dH_2O（for Dilution）で 4 倍希釈して使用します。

dH_2O (for Dilution)：
核酸抽出用試薬です。VI. サンプルの調製例「核酸の抽出」で Proteinase K の希釈に使用します。

Giardia Positive Control：
ジアルジア遺伝子検出用陽性コントロール、および検量線作成用のスタンダードとして使用します。プラスミド DNA のため、逆転写反応は不要です。

EASY Dilution (for Real Time PCR)：
検量線作成用のスタンダードサンプルを調製する際の鋳型 DNA の希釈用溶液です。
鋳型 DNA を滅菌水や TE で希釈すると、チューブへの吸着などにより正確な希釈ができない場合がありますが、本品を用いると低濃度までの正確な希釈が可能となります。また、本品は、キャリアーとして tRNA や rRNA などの核酸を使用していませんので、それらの配列に起因する非特異的増幅の問題が生じることもありません。

II. 保存

－ 20℃（輸送、保存とも）

III. キット以外に必要な機器、試薬（主なもの）

- リアルタイム PCR 装置および専用チューブ
  Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
  Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
  食品環境検査用ソフトウェア
  または、Thermal Cycler Dice Real Time System Software
  Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）など
- 卓上遠心器
- 200 μl、20 μl、10 μl 各マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
- サンプル調製に必要な試薬、器具（VI. サンプルの調製例を参照）

IV. 使用に際して

本キットを使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

(1) 使用目的：
本キットは環境分析に使用する製品です。

(2) 測定結果：
本キットは遺伝子検出を行うため、死んでいる原虫も検出されます。
陽性と判定されたサンプルについては、専門家に相談し、適切に対応されることを推奨します。必要に応じて、陽性サンプルは顕微鏡検査も行ってください。
（検査結果判定により発生する問題に関して、タカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。）

(3) 廃棄：
河川等の環境試料中には原虫以外に、細菌、ウイルス等による汚染も考えられますので、反応前の試料は感染性を疑い、各施設の安全規定に従って取り扱ってください。作業区域は常に清潔に保ち、白衣、マスク、手袋、ゴーグル等を使用し、必要に応じて検体や器材等は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理、または 2.5%次亜塩素酸ナトリウム液で処理を行った上、各施設の感染性廃棄処理マニュアルに従って処理してください。試薬を廃棄する際は多量の水で流してください。プラスチック、ろ紙の試薬容器ならびに器材は、廃棄物の処理および清掃に関する各自治体の条例等に従って処理してください。

V. 操作上の注意

(1) リアルタイム PCR 装置の取扱いは、各装置の取扱説明書に従ってください。

(2) 万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作は細心の注意を払ってください。

(3) 反応液の調製から検出まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。

○エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
○エリア 2：サンプルの調製を行います。
○エリア 3：検量線作成用スタンダードサンプルの調製、検体サンプルの反応液への添加と、反応および検出を行います。

本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物の入ったチューブの開閉や増幅産物をチューブから取り出すことは避けてください。

(4) 本キットはリアルタイム PCR 装置での解析によって結果判定を行います。リアルタイム PCR 装置の各種 Auto 機能が適正に働かなかった場合は誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、Manual 設定を行ってください。

VI. サンプルの調製例（エリア 2 で実施）

操作にあたっては、手袋、マスク、防御眼鏡を使用し、安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内で操作してください。サンプルがチューブキャップなどに付着している場合は、適宜スピンダウンを行ってから操作してください。
なお、下記に示す試料水の濃縮～シストの分離・精製の方法は、厚生労働省健康局水道課長通知「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について」（平成 19 年 3 月 30 日健水発第 033006 号）（平成 24 年 3 月 2 日健水発第 0302 第 2 ～ 4 号）に記載されたサンプル調製方法に準じています。

［試料水の濃縮］

上記通知別添 3 の「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための試験方法」に記載されている方法に従い、採取水量は、原水の場合で概ね 10 L、水道水で 20 L を標準として、アセトン溶解性メンブレンフィルター吸引濾過法あるいは加圧濾過法、親水性 PTFE メンブレンフィルター法などにより、最終的に約 10 ml の溶液を調製する。

［ジアルジアのシストの分離・精製］

試料水の濃縮溶液中に多量の夾雑物が含まれている場合に、ジアルジアのシストを選択的に分離して精製する方法として免疫磁気ビーズ法がある。クリプトスポリジウムおよびジアルジアを分離精製できる Dynabeads GC-combo（ベリタス社）などを利用してビーズ／シスト複合体を調製する。

【注意】夾雑物を含むサンプルは、逆転写反応およびリアルタイム PCR を阻害する可能性がある。
免疫磁気ビーズにシストが結合した状態で繰り返し洗浄を行い、夾雑物を完全に除去する。

[ビーズ／シスト複合体からのシストの解離]

（1）免疫磁気ビーズ濃縮法によるビーズ／シスト複合体に、0.01% Tween 80 を含む 0.1M 塩酸を 50 μl 加え、Vortex を 10 秒間行い、10 分間静置する。

（2）10 秒間 Vortex で激しく混合後、軽く遠心して液をチューブの底に落とす。

（3）磁石付きスタンドに取り付け 10 秒間静置し、ビーズを集める。

（4）シストを含む上清を新しい 1.5 ml チューブに回収する。

（5）上清を除いたビーズ入りチューブに、再度 0.01% Tween 80 を含む 0.1 M 塩酸を 50 μl 加え、Vortex を 10 秒間行い激しく混和する。

（6）磁石付きスタンドに取り付け 10 秒間静置し、上清を 1 回目の回収液 (4) に加える。

（7）回収した試料 100 μl に 1M 水酸化ナトリウム溶液を 10 μl 添加し試料を中和する。

（8）さらに TE buffer（10 mM Tris-HCl（pH7.6）、1 mM EDTA）を 200 μl 添加し、12,000 rpm、3 分間遠心する。上清 260 μl* を除いた後、残りの 50 μl を核酸抽出用サンプルとして用いる。本キットでの反応を直ちに実施しない場合は、核酸抽出用サンプルは冷凍保存（－ 20℃以下）する。

＊：顕微鏡観察を並行して実施する場合は上清 210 μl を除いた後、残りの 100 μl を懸濁し、50 μl ずつをそれぞれ核酸抽出用サンプルと顕微鏡観察用サンプルに用いる。

［核酸の抽出］

（1）核酸抽出用サンプル 50 μl について－ 80℃と 37℃の凍結融解操作を 5 回繰り返す。

（2）Lysis Buffer＊1 49 μl と dH_2O（for Dilution）＊1,2 で 4 倍希釈した Proteinase K＊1,2 1 μl を添加し、10 分ごとにタッピング混和を行いながら 60℃で 30 分間インキュベートする。

＊ 1：本キットに含まれる。
＊ 2：Proteinase K 溶液の希釈は、用時調製とする。

（3）超音波処理を 2 分間行う。

（4）75℃で 10 分間インキュベートしてシストの溶解を促進し、軽く遠心する。

（5）95℃で 5 分間インキュベート後、氷上で冷却する。この溶液をサンプル核酸溶液として用いる。
直ちに反応しない場合は、冷凍（－ 80℃）で保存が可能である。

【 調製上の注意 】

リアルタイム PCR による検出は、非常に高感度です。
実験環境や使用器具の汚染には極力注意を払い、コンタミネーションの防止にはご注意ください。

例）可能な限り、使い捨て器具を使用する（採水容器やフィルターホルダーなど）。
使い捨てにできないものは、洗浄後、乾熱滅菌処理を施す（ピンセットなど）。
マイクロピペットは用途別に準備する（リアルタイム PCR 試薬調製用、サンプル調製用を分ける）。

核酸（特に RNA）の調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は、清潔なマスクおよびディスポーザブルグローブを着用し RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。
実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用するようにし、実験台、実験器具などの RNase 除去には RNase-OFF™（製品コード 9037）の使用をお勧めします。また、RNA 実験に用いる器具（プラスチックおよびガラス）は、他の器具と区別して RNA 専用としてください。

VII. ＋／－判定の解析

※定量解析 (オプション) は、18 ページをご参照ください。

操作

(1) サンプルの調製 (VI. サンプルの調製例を参照)
(2) 逆転写反応
(3) リアルタイム PCR 装置のセッティング
(4) 反応液の調製と反応開始
反応液を調製
↓
反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール (RNase Free dH_2O)、検体サンプル、または陽性コントロール (*Giardia* Positive Control) を添加
↓
反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始
↓
(5) 結果表示
画面上にリアルタイムで増幅曲線が表示される
↓
反応終了
↓
判定

VII-1. 逆転写反応

判定の信頼性を高めるため、n=2 以上の反応を推奨します。

(1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
検体サンプル核酸溶液以外の下記反応液を測定サンプル数＋ α 分調製し、0.2 ml のマイクロチューブに分注する。

	液量 (1 反応)	最終濃度
5 × PrimeScript RT Master Mix	2 μl	1 ×
サンプル核酸溶液＊	1 ～ 5 μl	
RNase Free dH_2O＊	up to 10 μl	

＊: 添加するサンプル核酸溶液の量にあわせて、最終反応液量が 10 μl となるように RNase Free dH_2O の量を調節する。
検体水質またはサンプル核酸溶液の純度が低い場合は反応阻害を起こす可能性があります。そのような場合は、添加する核酸溶液を減らす、または、さらにサンプル核酸溶液の精製を行ってください。

(2) エリア 3 にて検体サンプル核酸溶液を添加し、以下の条件で逆転写反応を行う。
Thermal Cycler を使用すると便利である。

37℃　15 分 (逆転写反応)
85℃　 5 秒 (逆転写酵素を熱失活させる)
4℃

逆転写反応後のサンプルは、冷凍 (－ 20℃) での保存が可能である。

VII-2. リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

本キットは、1 本の反応チューブ内でジアルジアの 18S rRNA 遺伝子とインターナルコントロール DNA の増幅産物を同時に検出します。正しい検出結果を得るために、検体サンプル以外に陽性コントロール反応および陰性コントロール反応を一緒に行ってください。

(1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

検体サンプル等の鋳型以外の下記反応液を必要本数*1 + α分調製し、0.2 ml のマイクロチューブに 23 μl ずつ分注して軽くふたをする。その内の 1 本に陰性コントロールとして RNase Free dH_2O を 2 μl 加え、しっかりとふたをする。

	液量 (1 反応)	最終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture (*Giardia*)	12.5 μl	1 ×
Giardia Primer/Probe Mix (FAM、ROX)	5.0 μl	1 ×
RNase Free dH_2O	5.5 μl	
検体サンプル (逆転写反応液) または *Giardia* Positive Control または RNase Free dH_2O *2	(2 μl) *2	
Total	25 μl	

＊ 1：検体サンプル数＋ 2 本 (陰性コントロール反応、陽性コントロール反応)
＊ 2：検体サンプルまたは *Giardia* Positive Control は、ステップ (2) で加えるため、ここでは加えない。
逆転写反応液をリアルタイム PCR の系に持ち込む量は、PCR 反応液容量の 10%までとしてください。

【注意】蛍光ノイズの原因になりますので、チューブやふたには素手で触れないようご注意ください。

(2) 鋳型の添加 (エリア 3 で実施)

陰性コントロール以外の各チューブに、検体サンプル (逆転写反応液) または *Giardia* Positive Control を 2 μl 添加し、しっかりとふたをする。
0.2 ml のマイクロチューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

【注意】反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始してください。

VII-3. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出（エリア 3 で実施）

操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。
Thermal Cycler Dice Real Time System II（タカラバイオ）および Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）を使用した場合の簡単な操作法と結果の判定について示します。

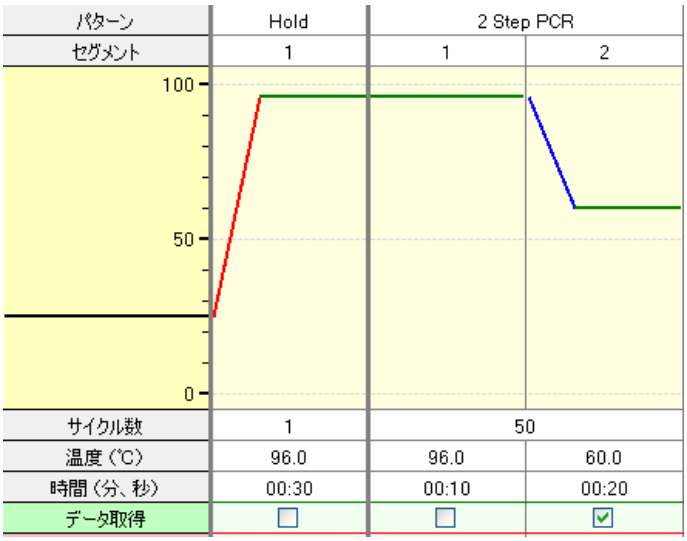
【Thermal Cycler Dice Real Time System II の場合】
（食品環境検査用ソフトウェア）

（1）ランファイルを新規作成し、" 新規測定 " 画面において解析タイプ＜＋／－判定＊＞を選択し、OK ボタンをクリックする。

＊：＋／－判定は、食品環境検査用ソフトウェアに搭載された機能です。Thermal Cycler Dice Real Time System Software をご使用の場合は、＜ PM(M) Plus/Minus Assay ＞を使用します。
解析ソフトのバージョンアップが必要な場合は、弊社ウェブサイトのダウンロードサービス「Thermal Cycler Dice Real Time System ソフトウェアバージョンアップのご案内」よりダウンロードしてください。

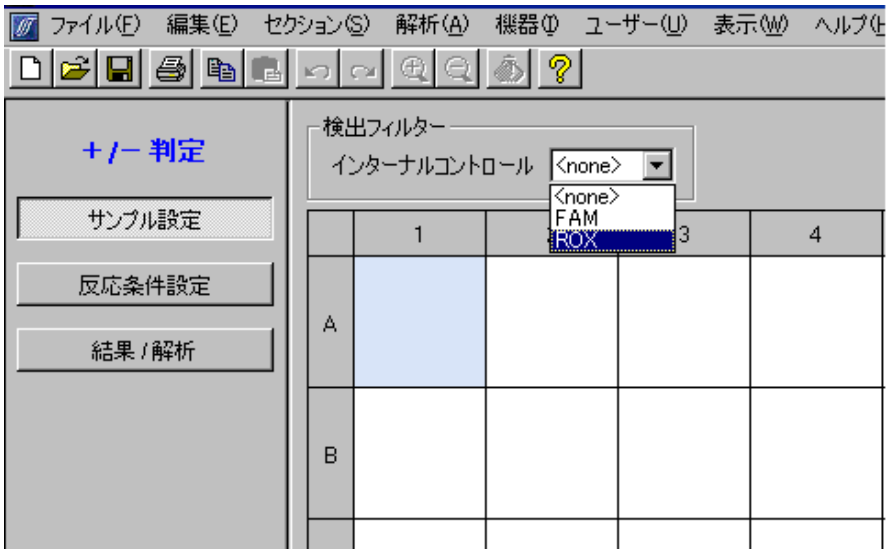
（2）" 反応条件設定 " 画面で PCR 条件を設定する。デフォルト条件とは異なるので、指定の条件に設定する。

初期変性（Hold）
　Cycle：1
　96℃　30 秒
2 step PCR
　Cycle：50
　96℃　10 秒
　60℃　20 秒（データ取得）

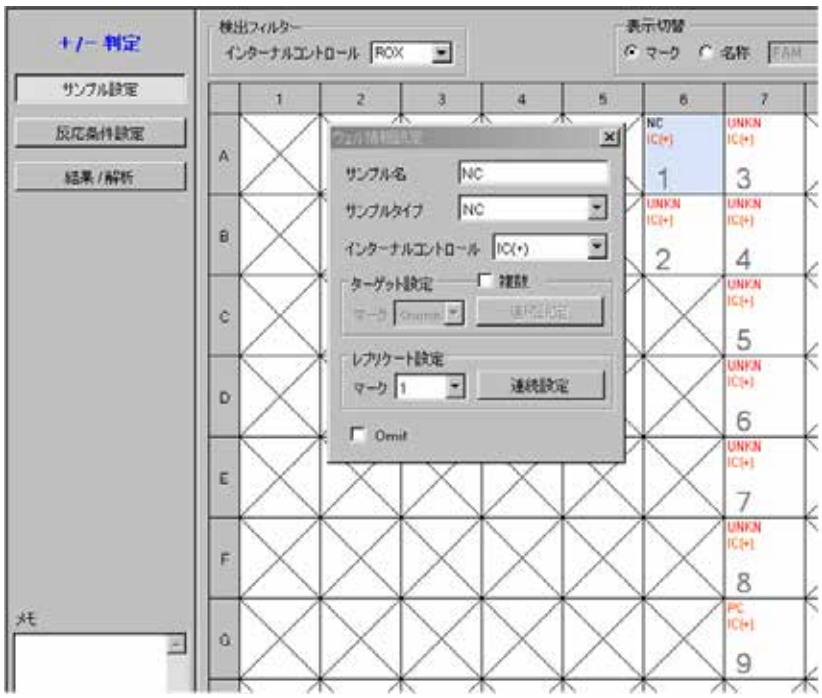


(3) 画面右下の“反応開始”ボタンをクリックして反応を開始する。

(4) “サンプル設定”画面で「検出フィルター　インターナルコントロール」を ROX と選択する。

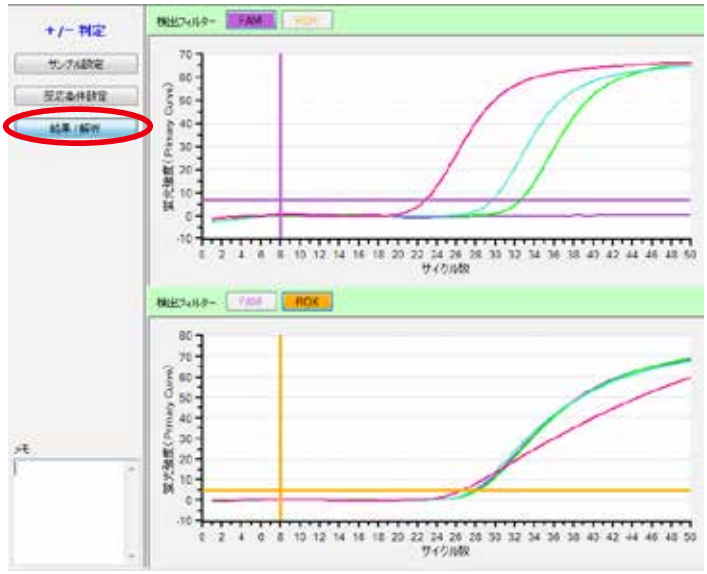


「入力」ボタンをクリックしウェル情報設定を行う。
反応に使用しないウェルは Omit 設定する。



（5）結果解析

1. 反応終了後、“ 結果 / 解析 ” ボタンをクリックする。

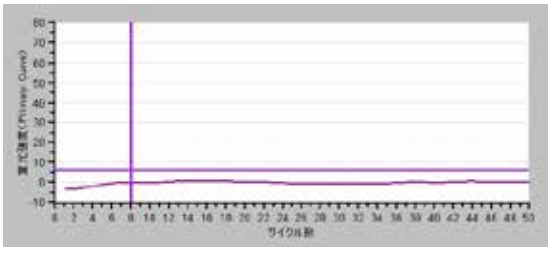


検出フィルターで FAM ボタンを選択すると、ジアルジア検出の増幅曲線が表示される。【 上部図 】
検出フィルターで ROX ボタンを選択するとインターナルコントロール（IC）検出の増幅曲線が表示される。【 下部図 】（閾値は Auto で表示）

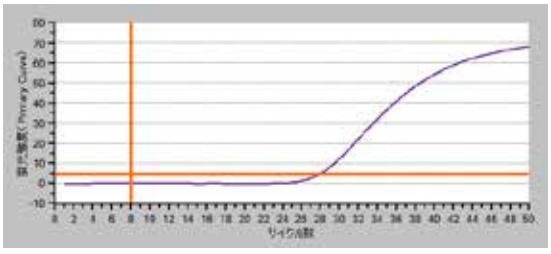
2. NC（陰性コントロール反応）、PC（陽性コントロール、*Giardia* Positive Control）の増幅曲線を確認する。

● NC の増幅曲線
表示セレクトで＜ N ＞を選択。
FAM フィルターにおいて蛍光のシグナル変化が無いベースラインが得られ閾値を超えていないこと、ROX フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター（ジアルジア検出）

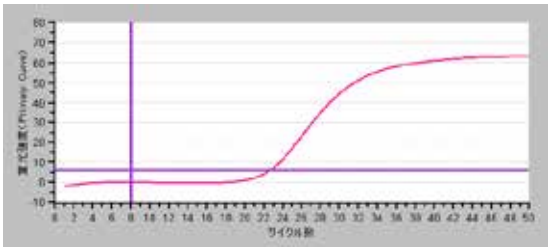


ROX フィルター（IC 検出）

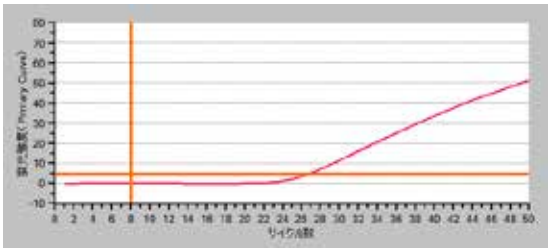


● PC の増幅曲線
表示セレクトで＜ P ＞を選択。
PC において FAM フィルターで増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター（ジアルジア検出）



ROX フィルター（IC 検出）



3. 表示セレクトで＜ U ＞を選択し、検体サンプルの増幅曲線を確認する。

（6）結果の表示
データ解析＜判定結果＞を選択する。

総合判定結果の表示について

陰性コントロール＜ N ＞、陽性コントロール＜ P ＞の表示
OK　：反応が正常に進んだ
OUT　：反応に問題があった

検体サンプル＜ U ＞の表示
Posi.　：ジアルジア遺伝子の検出が陽性
Nega.：ジアルジア遺伝子が検出限界以下
ND　：判定不能（PCR 反応が正しく進まなかった。）
インターナルコントロール、ジアルジア遺伝子とも検出せず、判定不能。
Error　：同一レプリケート番号の判定が異なる

判定は、閾値を超えているか否かにより行います。

■ 判定結果についての注意事項

（1）陰性コントロール反応において、総合判定解析が「OUT」となった。

● ジアルジア遺伝子検出において、増幅曲線が得られた。
→ 試薬中に目的産物が混入した可能性がある。再度、コンタミネーションに注意し反応を行う。

（2）陽性コントロール DNA 反応において、総合判定解析が「OUT」となった。

● ジアルジア遺伝子（FAM）、インターナルコントロール（ROX）ともに増幅曲線が得られなかった。
→ 何らかの原因で PCR 反応、またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。反応液の調製にミスがないことを確認し、再度反応を行う。

● インターナルコントロール（ROX）では増幅曲線が得られるが、ジアルジア遺伝子（FAM）では増幅曲線が得られなかった。
→ *Giardia* Primer/Probe Mix に問題がある。または、*Giardia* Positive Control が分解している可能性がある。

（3）検体サンプル反応において、総合判定解析が「ND」となった。

● ジアルジア遺伝子（FAM）、インターナルコントロール（ROX）ともに増幅曲線が得られなかった。
→ サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、サンプルを希釈する、または検体サンプルの再調製を行った後、再度反応を行う。

【 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）Ver 2.0 の場合 】

（1）Experiment Properties 画面設定を行う。

・Quantitation-Standard Curve を選択する。
・TaqMan Reagents または Other を選択する。

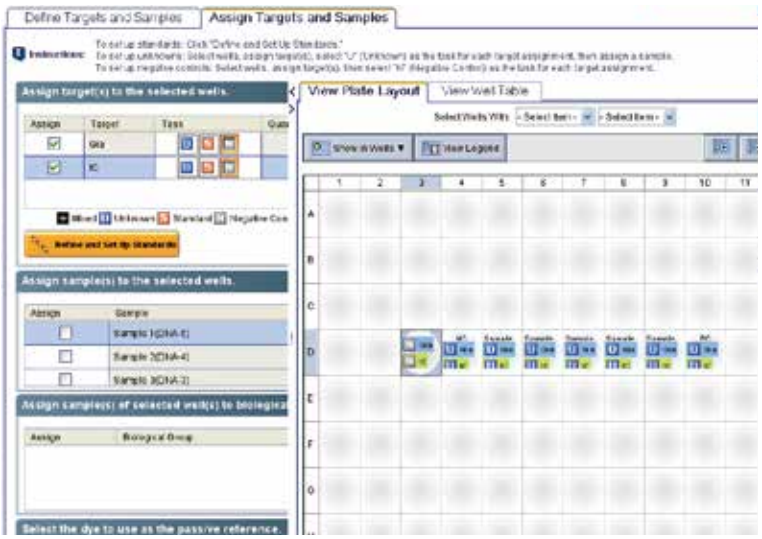
（2）Plate Setup の Define Target で Target name を 2 種設定する。

・*Giardia*：Reporter を FAM、Quencher を None と設定する。
・IC　　：Reporter を ROX、Quencher を None と設定する。

（3）Define Sample にて NC、Positive Control と検体サンプルを設定する。

（4）作成した設定を用いて Plate Layout を設定する。

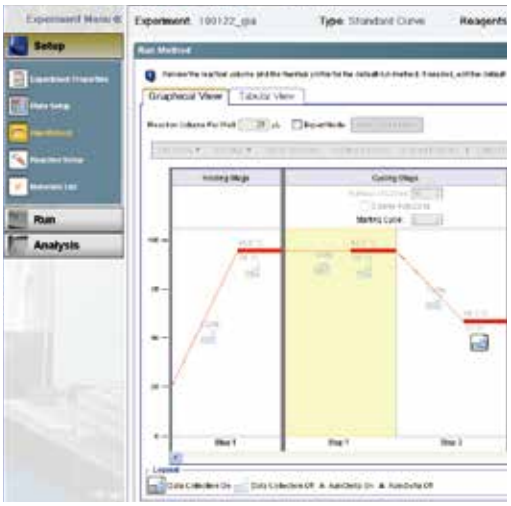
Passive Reference は（none）にする。



（5）Instrument タブを選択し、反応条件を設定する。

初期変性（Hold）
　Cycle：1
　96℃　30 秒
2 step PCR
　Cycle：50
　96℃　10 秒
　60℃　25 秒＊（データ取得）

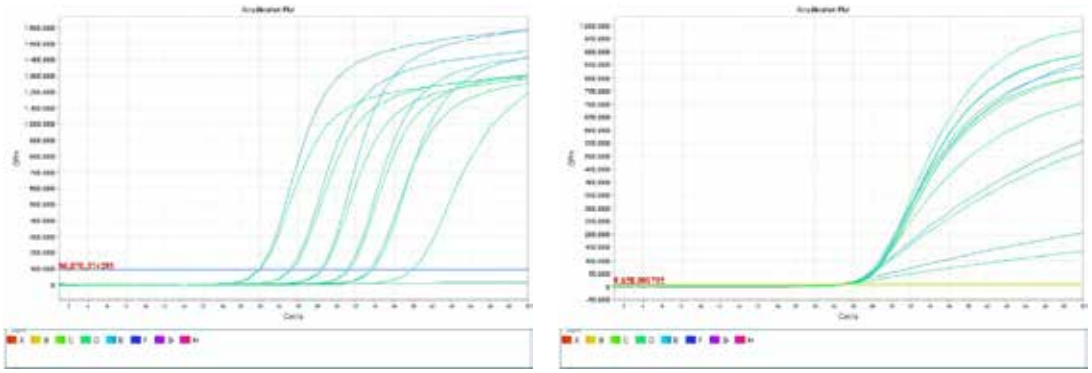
＊：データ取得は 25 秒必要です。



(6) 反応チューブをセットし、Start ボタンをクリックして反応を開始する。

(7) 反応終了後、Analysis 画面の Amplification Plot で増幅曲線を確認する。
Threshold、Baseline は必要に応じて Manual にて設定する。

ジアルジア検出（FAM）　　IC 検出（ROX）



(8) View Well Table タブをクリックし、ジアルジアの検出の有無を確認する。

#	Well	Sample ...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct
	NC							
1	D4	NC	Gia	UNKNOWN	FAM-None	Undetermi...		
2	D4	NC	IC	UNKNOWN	ROX-None	28.368	28.368	
	PC							
3	D10	PC	Gia	UNKNOWN	FAM-None	24.251	24.251	
4	D10	PC	IC	UNKNOWN	ROX-None	27.976	27.976	
	Sample 1(DNA-5)							
5	D5	Sample 1(...	Gia	UNKNOWN	FAM-None	38.398	38.398	
6	D5	Sample 1(...	IC	UNKNOWN	ROX-None	28.357	28.357	
	Sample 2(DNA-4)							
7	D6	Sample 2(...	Gia	UNKNOWN	FAM-None	34.225	34.225	
8	D6	Sample 2(...	IC	UNKNOWN	ROX-None	28.389	28.389	
	Sample 3(DNA-3)							
9	D7	Sample 3(...	Gia	UNKNOWN	FAM-None	30.796	30.796	
10	D7	Sample 3(...	IC	UNKNOWN	ROX-None	27.993	27.993	
	Sample 4(PC0)							

※ StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies 社）も同様な操作で使用できます。ただし、ROX の検出感度が低いため、全 target を同時に表示すると、ROX（IC）の増幅曲線が小さく表示されます。FAM と ROX の target を別々に表示させて解析してください。

VII-4. 判定結果表

判定結果表 1：検体サンプルを添加した場合
（各コントロール反応結果とあわせて最終判定を行うこと）

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（ジアルジア）検出	増幅シグナル（＋）	陽性＊1	陽性＊1
	増幅シグナル（－）	検出限界以下＊2	判定不能＊3

判定結果表 2：陽性コントロール（*Giardia* Positive Control を添加したもの）

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（ジアルジア）検出	増幅シグナル（＋）	ジアルジア検出系に問題なし	ジアルジア検出系に問題なし
	増幅シグナル（－）	ジアルジア検出系に問題あり＊4	判定不能＊3

判定結果表 3：陰性コントロール（RNase Free dH_2O を添加したもの）

		ROX（インターナルコントロール）	
		増幅シグナル（＋）	増幅シグナル（－）
FAM（ジアルジア）検出	増幅シグナル（＋）	コンタミネーションの疑い＊5	コンタミネーションの疑い＊5
	増幅シグナル（－）	コンタミネーションなし	判定不能＊3

＊1： インターナルコントロールの（＋）/（－）に関らず、ジアルジア由来 18S rRNA 遺伝子が陽性である。陰性コントロール反応の結果から反応系にコンタミネーションがなかったことを確認すること。
＊2： 陽性コントロール反応の結果で（＋）となり反応系に問題がないことを確認すること。
＊3： 何らかの原因で PCR 反応またはサイクリングプローブ検出が正常に行われていない。再反応を行う。サンプル中に反応阻害物質が含まれている可能性もあるので、場合によっては検体の希釈や再調製が必要。
＊4： ジアルジア由来 18S rRNA 遺伝子検出増幅用プライマーあるいはプローブに問題があるか、*Giardia* Positive Control が分解している。
＊5： コンタミネーションの疑いがある場合は、反応液の調製場所および使用する機器を除染したうえで再反応を行う。

VIII. *Giardia* Positive Control を用いる定量解析＜オプション＞

＋／－判定の解析は、8 ページをご参照ください。

本キットに含まれる *Glardia* Positive Control は、ジアルジアの 18S rRNA 遺伝子領域を搭載したプラミド DNA で、OD_{260} 値より換算した値で 1×10^5 copies/ μ l に調整されています。EASY Dilution (for Real Time PCR) を用いて *Giardia* Positive Control の 10 倍の段階希釈系列を作製し、スタンダードサンプルとして用いて検量線を作成することで、定量解析を行うことができます。

(1) サンプルの調製 (VI. サンプルの調製例を参照)
(2) 逆転写反応
(3) リアルタイム PCR 装置のセッティング
(4) 反応液の調製と反応開始
反応液を調製
↓
Giardia Positive Control を段階希釈して検量線作成用スタンダードサンプルを調製
↓
反応液を反応チューブに分注し、陰性コントロール (RNase Free dH_2O)、検体サンプル、または検量線作成用スタンダードサンプルを添加
↓
反応チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし反応を開始
↓
(5) 結果表示
画面上にリアルタイムで増幅曲線が表示される
↓
反応終了
↓
検量線から検体サンプルのコピー数 (プラスミド換算値) を求める

VIII-1. 逆転写反応

判定の信頼性を高めるため、n=2 以上の反応を推奨します。

(1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)
検体サンプル核酸溶液以外の下記反応液を測定サンプル数＋ α 分調製し、0.2 ml のマイクロチューブに分注する。

	液量 (1 反応)	最終濃度
5 × PrimeScript RT Master Mix	2 μl	1 ×
サンプル核酸溶液＊	2 μl	
RNase Free dH_2O	6 μl	
Total	10 μl	

＊：検体水質またはサンプル核酸溶液の純度が低い場合は、反応阻害を起こす可能性があります。そのような場合は、さらにサンプル核酸溶液の精製を行ってください。

(2) エリア 3 にてサンプル核酸溶液を添加し、以下の条件で逆転写反応を行う。
Thermal Cycler を使用すると便利である。

37℃　15 分 (逆転写反応)
85℃　 5 秒 (逆転写酵素を熱失活させる)
4℃

逆転写反応後のサンプルは、冷凍 (－ 20℃) で保存が可能である。

VIII-2. リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

本キットは、1 本の反応チューブ内でジアルジアの 18S rRNA 遺伝子とインターナルコントロール DNA の増幅産物を同時に検出します。正しい検出結果を得るために、検体サンプル以外に検量線作成用のスタンダードサンプル反応および陰性コントロール反応を一緒に行ってください。

(1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。(エリア 1 で実施)

検体サンプル等の鋳型以外の下記反応液を必要本数*1 + α分調製し、0.2 ml のマイクロチューブに 23 μl ずつ分注し、軽くふたをする。その内の 1 本に陰性コントロールとして RNase Free dH_2O を 2 μl 加え、しっかりとふたをする。

	液量(1 反応)	最終濃度
2 × Cycleave Reaction Mixture (*Giardia*)	12.5 μl	1 ×
Giardia Primer/Probe Mix (FAM、ROX)	5.0 μl	1 ×
RNase Free dH_2O	5.5 μl	
検体サンプル(逆転写反応液)または 検量線作成用スタンダードサンプルまたは RNase Free dH_2O *2	(2 μl) *2	
Total	25 μl	

＊1：検体サンプル数＋検量線作成用スタンダードサンプル数＋陰性コントロール数
＊2：検体サンプル等の鋳型は、ステップ (3) で加えるため、この段階では加えない。

【注意】蛍光ノイズの原因になりますので、チューブやふたには素手で触れないようにご注意ください。

(2) *Giardia* Positive Control を用いて、検量線作成用スタンダードサンプルの段階希釈液を調製する。(エリア 3 で実施)

EASY Dilution (for Real Time PCR) を用い、以下の 2 ～ 6 の濃度の段階希釈液を調製する。(1 反応にはそれぞれ 2 μl を使用。n=2 以上の反応を推奨)

1. 1×10^5 copies/μl (*Giardia* Positive Control 原液)
2. 1×10^4 copies/μl (*Giardia* Positive Control 原液 5 μl + EASY Dilution 45 μl)
3. 1×10^3 copies/μl (2. の 1×10^4 copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl)
4. 1×10^2 copies/μl (3. の 1×10^3 copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl)
5. 10 copies/μl (4. の 1×10^2 copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl)
6. 1 copy/μl (5. の 10 copies/μl 溶液 5 μl + EASY Dilution 45 μl)

(3) 鋳型の添加 (エリア 3 で実施)

陰性コントロール以外のチューブに、検体サンプル (逆転写反応液) または検量線用スタンダードサンプルをそれぞれ 2 μl 添加し、しっかりとふたをする。
0.2 ml のマイクロチューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

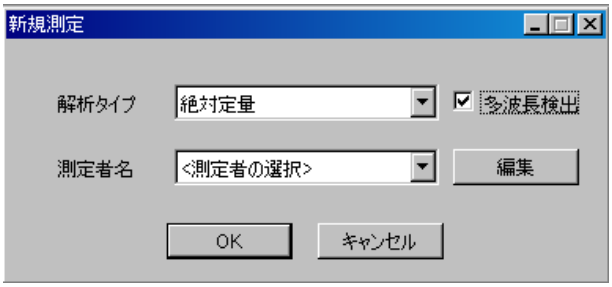
【注意】反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始してください。

VIII-3. リアルタイム PCR 装置による増幅および検出（エリア 3 で実施）

操作の手順は、それぞれのリアルタイム PCR 装置で異なります。詳しい操作方法は、それぞれの機器に添付されている説明書をご確認ください。
Thermal Cycler Dice Real Time System //（タカラバイオ）を使用した場合の簡単な操作法と、結果の判定について示します。

【 Thermal Cycler Dice Real Time System // の場合 】
（食品環境検査用ソフトウェア）

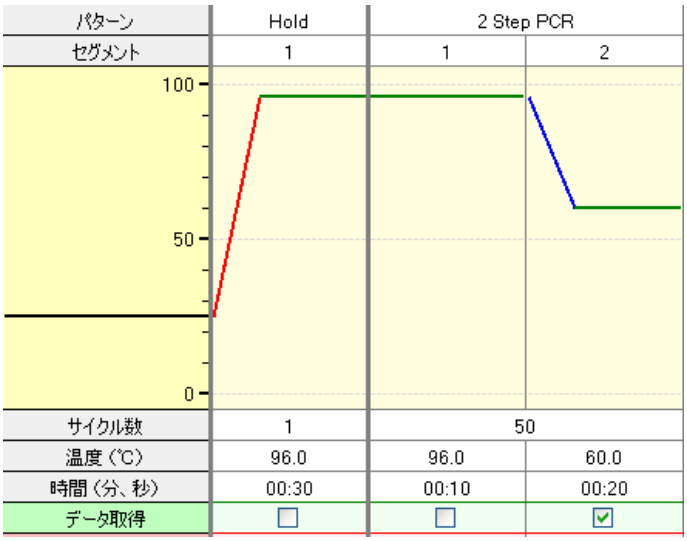
（1）ランファイルを新規作成し、" 新規測定 " 画面において解析タイプ≪ 絶対定量＊ ≫を選択し、多波長検出に☑ を入れ、OK ボタンをクリックする。



＊：Thermal Cycler Dice Real Time System Software をご使用の場合は＜ AQ(M) Absolute Quantification ＞を使用します。

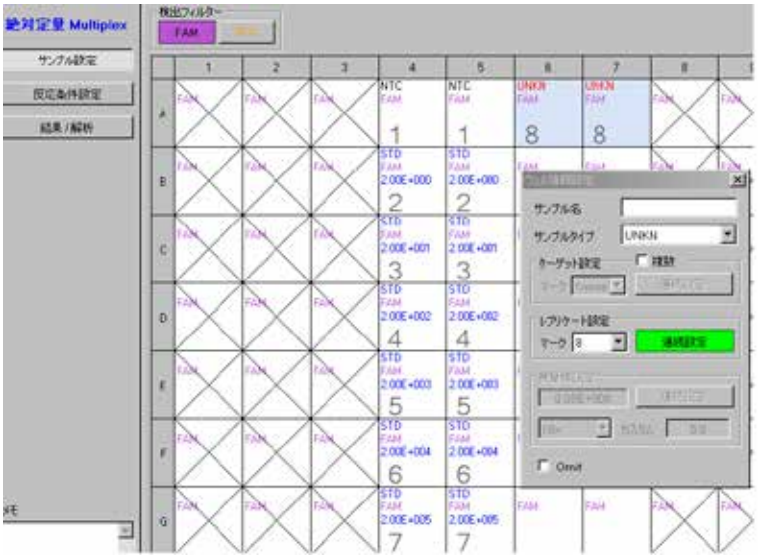
（2）" 反応条件設定 " 画面で PCR 条件を設定する。デフォルト条件とは異なるので、指定の条件に設定する。

初期変性（Hold）
　Cycle：1
　96℃　30 秒
2 step PCR
　Cycle：50
　96℃　10 秒
　60℃　20 秒（データ取得）



(3) 画面右下の“反応開始”ボタンをクリックして反応を開始する。

(4) “サンプル設定”画面で“入力”ボタンをクリックしウェル情報設定を行う。反応に使用しないウェルは Omit 設定する。



サンプルタイプ設定

設定するウェルを選択し、サンプルタイプをドロップダウンメニューから選択する。

UNKN [Unknown] ：測定対象である検体サンプル
STD [Standard] ：検量線作成用のスタンダードサンプル
NTC [No Template Control] ：鋳型なしの陰性コントロール反応

レプリケート設定

同一の反応を行うウェルを選択して、レプリケートマーク 1, 2, 3, 4・・・を指定する。
連続設定機能により、連続入力が可能です。

検量線設定

1. 最小または最大の初期鋳型量＊のウェルを選択し、ボックス内に初期鋳型量を入力。
2. “連続設定”ボタンをクリックする。
3. ドロップダウンメニューから、希釈倍率を選択する。
4. 次の濃度のウェルをクリックすると、最初の数値に倍率を掛けた数値が入力される。
5. 設定を解除するには、再度“連続設定”ボタンをクリックする。

＊：初期鋳型量は、反応液中に含まれるコピー数を入力する。

（5）結果解析

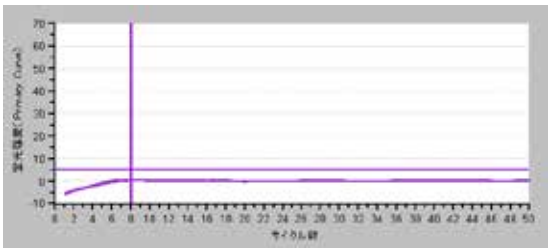
1. 反応終了後、“ 結果／解析 ” ボタンをクリックする。

   検出フィルターで FAM ボタンを選択するとジアルジア検出の増幅曲線が表示される。検出フィルターで ROX ボタンを選択すると、インターナルコントロール DNA（IC）検出の増幅曲線が表示される。（閾値は Auto で表示）

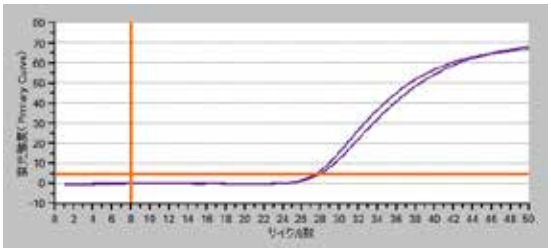
2. NC（陰性コントロール）、STD（検量線スタンダードサンプル）の増幅曲線を確認する。

   ● NC の増幅曲線の表示：表示セレクトで＜ N ＞を選択。
   FAM フィルターにおいて蛍光のシグナル変化が無いベースラインが得られ閾値を超えていないこと、ROX フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター（ジアルジア検出）

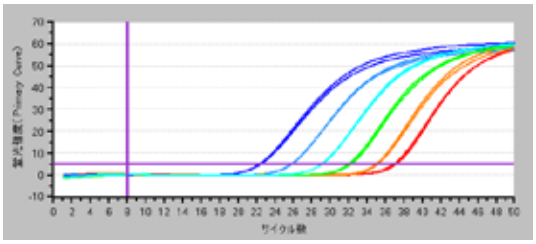


ROX フィルター（IC 検出）

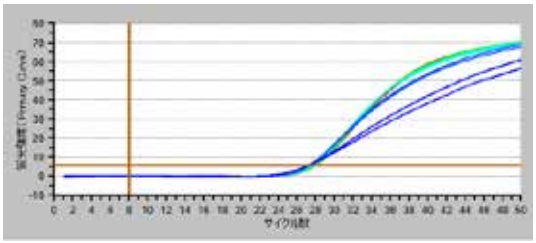


   ● STD（検量線スタンダードサンプル）の増幅曲線の表示：表示セレクトで＜ S ＞を選択。
   FAM フィルターにおいて増幅曲線が描かれ閾値を超えていることを確認する。ROX フィルターにおいても増幅曲線が描かれ、閾値を超えていることを確認する。

FAM フィルター（ジアルジア検出）



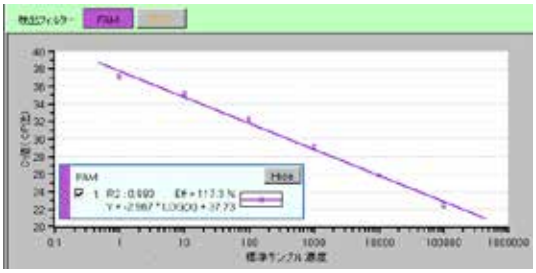
ROX フィルター（IC 検出）



3. 表示セレクトで＜U＞を選択し、検体サンプルの増幅曲線を確認する。

4. 検量線確認

   データ解析のドロップダウンメニューから検量線を選択する。



必要に応じて、検量線より外れている測定値は Omit 設定を行う。

1）表示セレクトで Omit するウェルを選択する。

2）右クリックし、Omit → Set を選択すると、選択したウェルが解析より除外できる。Omit → Reset を選択すると、再度解析に用いることが可能となる。

（6）結果の表示

テキストレポート表示

1. データ解析からテキストレポートを選択すると、グラフ表示領域にテキストレポートが表示できる。

2. 表示セレクトで表示させるウェルを選択する。

3. 表示形式で、表示させるデータセットを選択する。

   ウェル　　：個々のウェルに関する解析結果

   レプリケート：レプリケート（ターゲットとサンプルの組合せが同一のグループ）ごとの解析結果（平均値や標準偏差など）

   全選択　　：すべての解析結果を表示

4. 表示項目のチェックボックスでその下の詳細項目リストに表示させる項目を選択する。

   CP 法データ　：Crossing Point 法による解析結果の項目

5. 詳細項目リストの各項目のチェックボックスよりテキストレポートへの表示／非表示の変更ができる。

6. テキストレポートの項目名をクリックすると、クリックした項目でソートできる。

表示例）

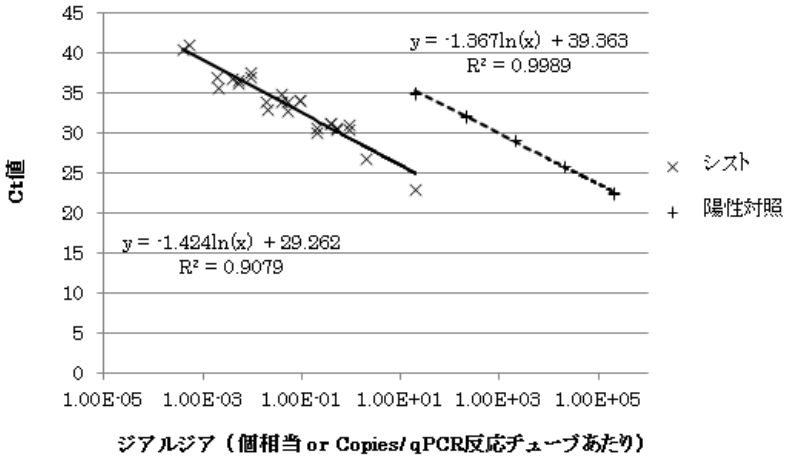
検出フィルター FAM

サンプルタイプ	レプリケート名	Ct値(CP)	平均Ct値(CP)	標準サンプル濃度	定量値(CP)	定量平均値(CP)
UNKN	Sample2	36.22	36.56	–	3.228E+000	2.574E+000
UNKN	Sample2	36.89	36.56	–	1.919E+000	2.574E+000
UNKN	Sample1	25.81	26.02	–	1.041E+004	8.964E+003
UNKN	Sample1	26.23	26.02	–	7.516E+003	8.964E+003
NTC	NC	–	–	–	–	–
NTC	NC	–	–	–	–	–
STD		36.96	37.09	1.000E+000	1.818E+000	1.657E+000
STD		37.21	37.09	1.000E+000	1.497E+000	1.657E+000
STD		35.03	35.13	1.000E+001	8.128E+000	7.571E+000
STD		35.22	35.13	1.000E+001	7.014E+000	7.571E+000
STD		32.30	32.18	1.000E+002	6.763E+001	7.487E+001
STD		32.05	32.18	1.000E+002	8.211E+001	7.487E+001
STD		29.16	29.15	1.000E+003	7.735E+002	7.826E+002
STD		29.13	29.15	1.000E+003	7.917E+002	7.826E+002
STD		25.85	25.88	1.000E+004	1.009E+004	9.901E+003
STD		25.90	25.88	1.000E+004	9.709E+003	9.901E+003
STD		22.41	22.47	1.000E+005	1.457E+005	1.392E+005
STD		22.53	22.47	1.000E+005	1.327E+005	1.392E+005

【注意】本キットは、遺伝子検出用キットであるため、死んでいる原虫も検出されます。
また、サンプル保存等の過程での劣化、サンプルに含まれている阻害物質の量、逆転写反応効率などの影響により、原虫に含まれる実際のコピー数と算出されたプラスミドのコピー数が異なる場合があります。

＜解析例＞

出典：平成 23 年度厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）「水道における水質リスク評価および管理に関する総合研究（研究代表者：松井佳彦）」より、平成 23 年度微生物分科会分担研究報告書



※ 上記出典において、「ジアルジア 1 シストあたりの 18S rRNA 量は、サイクリングプローブ法で 1,600 コピーに相当すると計算された。」と記載されています。
なお、上記出典における図中の陽性対照および文中の PC は、本キットに含まれる *Giardia* Positive Control です。

【注意】サンプル保存等の過程での劣化、サンプルに含まれている阻害物質の量、逆転写反応効率などの影響により、原虫の個数とプラスミドのコピー数の関係が上記解析例と異なる場合があります。

IX. 参考データ

IX-1. 検出可能な種

検出が可能であった種：

Giardia lamblia（Assemblage A）

Giardia Primer/Probe Mix の配列情報から検出が可能と推測される種：

Giardia lamblia（Assemblage B、Assemblage C 、Assemblage D、Assemblage E）
Giardia psittaci
Giardia microti

IX-2. クロス反応

以下の種について、クロス反応がないことを確認しています。
Cryptosporidium parvum

X. 参考文献

1) Kwannan N. *et al* (2007) *Journal of Microbiology* **45** (2), 581-583

2) Richad M. Hopkins, *et al* (1997) *J.Parasitol*. **83** (1), 44 -51

XI. 関連製品

Cycleave® RT-PCR *Cryptosporidium*(18S rRNA) Detection Kit（製品コード CY230）
Cycleave®PCR *Legionella* (16S rRNA) Detection Kit（製品コード CY240/CY240S）
Cycleave®PCR *Legionella* (5S rRNA) Detection Kit（製品コード CY210）

Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）
96 well Hi-Plate for Real Time（製品コード NJ400）
Sealing Film for Real Time（製品コード NJ500）
Plate Sealing Pads（製品コード 9090）
0.2 ml Hi-8-Tube（製品コード NJ300）
0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ302）

XII. 注意

- 本製品は、食品分析および環境分析用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。検査結果判定により発生する問題に関してタカラバイオ株式会社は一切の責任を負いません。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

ご注意
本製品は、Epoch Biosciences, Inc. のクエンチャーのライセンスを受け、製造・販売されています。
本製品は、生命科学研究分野、食品検査を含む工業的検査分野、環境分析、法医学や動物診断における検出用です。また、これらの分野において、第三者に検出サービスを提供するために、本製品を商業目的で使用することができます。ヒトの医療、治療、診断や動物の医療、治療、およびバイオテロに関連する分析、患者の処置あるいは治療方法を選択するための用途には使用できません。
本製品は、Epoch Biosciences, Inc. 保有の特許（US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830）のライセンスのもと製造・販売されており、本製品と関連技術に関する権利は、上記特許の及ぶ範囲において Epoch Biosciences, Inc. に属します。下記注にある商業用途のライセンスは包含されていませんので、当該商業目的の使用には、Epoch Biosciences, Inc. からの別途ライセンスが必要です。

（注）別途ライセンスが必要な商業用途には以下の用途を含みます。
A: 本製品、あるいは本製品により派生するものを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。
B: 本製品、あるいは本製品により派生するものの使用権につき、第三者にリース・ライセンス・その他の権利付与をおこなうこと。
C: 本製品を含有するキットを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。

ライセンスについてお問い合わせ先：
タカラバイオ株式会社
Tel　077-543-6116　Fax　077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[L4] Quencher
This product is for measurement of amplification detection for research use only in life sciences research, industrial and environmental testing (including food industry, but excluding bio-terrorism and bio-warfare), non-human animal diagnostic testing, forensic testing and providing services to third parties who do not use the services for the purpose of (a) providing patient management or care, and in which the results of such services are not included in patient records and (b) providing bio-terrorism or bio-warfare testing; and specifically excluding, without limitation: (I) any human clinical, therapeutic or diagnostic uses and animal clinical and therapeutic uses (including any use of the results of any testing performed with any product for patient management or care, or the use of the results of the services for patient management or care) and (II) any research or services where the results of any test or assay are used for patient management, care or otherwise in making therapeutic or treatment decisions for a patient.
A portion of this product is subject to proprietary rights of Epoch Biosciences, Inc. and are made and sold under license from Epoch Biosciences, Inc. under the patents and patent applications (US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830 and corresponding patents issued in other countries).
There is no implied license for commercial use with respect to this product. A license must be obtained directly from Epoch Biosciences, Inc. with respect to any proposed commercial use of this product, and “commercial use” includes but is not limited to (A) the sale, lease, license or other transfer of this product or any material derived or produced from it, (B) the sale, lease, license or other grant of rights to use this product or any material derived or produced from it, and (C) the sale, lease, license or other transfer of kits which include this product.

[M40] Thermostable RNase H
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,422,888 and its foreign counterpart patent claims.

[M46] PCR-Cycleave
This product is covered by the claims of Japanese Patent No. 4022522.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 outside the U.S. corresponding to the expired U.S. Patent No. 5,436,149.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201402Da